

**AKTIVITAS SITOTOKSIK EKSTRAK ETANOL DAUN BAYAM MERAH
(*Amaranthus gangeticus*) TERHADAP SEL HeLa DAN WiDr**



**Disusun sebagai salah satu syarat menyelesaikan Program Studi Strata I Pada Jurusan Farmasi
Fakultas Farmasi**

Oleh:

DIANA RACHMA NINGSIH

K 100150156

**PROGRAM STUDI FARMASI
FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS MUHAMMADIYAH SURAKARTA**

2019

HALAMAN PERSETUJUAN

**AKTIVITAS SITOTOKSIK EKSTRAK ETANOL DAUN BAYAM MERAH
(*Amaranthus gangeticus*) TERHADAP SEL HeLa DAN WiDr**

PUBLIKASI ILMIAH

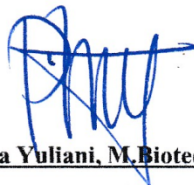
oleh:

DIANA RACHMA NINGSIH

K 100 150 156

Telah diperiksa dan disetujui untuk diuji oleh:

Dosen Pembimbing



Ratna Yuliani, M. Biotech.St

NIK. 957

HALAMAN PENGESAHAN

**AKTIVITAS SITOTOKSIK EKSTRAK ETANOL DAUN BAYAM MERAH
(*Amaranthus gangeticus*) TERHADAP SEL HeLa DAN WiDr**

OLEH

DIANA RACHMA NINGSIH

K 100 150 156

**Telah dipertahankan di depan Dewan Penguji
Fakultas Farmasi
Universitas Muhammadiyah Surakarta
Pada hari Senin, 28 Januari 2019
dan dinyatakan telah memenuhi syarat**

Dewan Penguji:

- 1. Dr. Muhammad Dai, Apt
(Ketua Dewan Penguji)**
- 2. Dr. Haryoto, M.Sc
(Anggota I Dewan Penguji)**
- 3. Ratna Yuliani, M.Biotech.St
(Anggota II Dewan Penguji)**

(.....)
(.....)
(.....)



Azis Saifudin, Ph.D., Apt

NIK. 956

PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa dalam publikasi ilmiah ini tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan di suatu perguruan tinggi dan sepanjang pengetahuan saya juga tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan orang lain, kecuali secara tertulis diacu dalam naskah dan disebutkan dalam daftar pustaka.

Apabila kelak terbukti ada ketidakbenaran dalam pernyataan saya di atas, maka akan saya pertanggungjawabkan sepenuhnya.

Surakarta, 12 Februari 2019

Penulis



DIANA RACHMA NINGSIH

K 100 150 156

AKTIVITAS SITOTOKSIK EKSTRAK ETANOL DAUN BAYAM MERAH (*Amaranthus gangeticus*) TERHADAP SEL HeLa DAN WiDr

Abstrak

Pengobatan kanker umumnya dilakukan dengan terapi konvensional yang diketahui memiliki biaya mahal dan efek samping yang tinggi. Sehingga diperlukan alternatif terapi lain dengan tanaman, contohnya bayam merah (*Amaranthus gangeticus*). Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui aktivitas sitotoksik ekstrak etanol daun bayam merah terhadap sel HeLa dan sel WiDr dan untuk mengetahui golongan senyawa yang terdapat dalam ekstrak etanol daun bayam merah. Daun bayam merah diekstraksi dengan metode maserasi menggunakan etanol 90%. Uji sitotoksitas dilakukan dengan menggunakan MTT assay yang hasilnya berupa nilai IC_{50} . Analisis kandungan senyawa dilakukan dengan menggunakan metode kromatografi lapis tipis (KLT) dengan fase diam silika GF245 dan fase gerak heksana : etil asetat (5:5). Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun bayam merah memiliki nilai IC_{50} sebesar 209 $\mu\text{g/mL}$ pada sel HeLa dan tidak menunjukkan penghambatan 50% populasi pada sel WiDr. Ekstrak etanol daun bayam merah memiliki kandungan kimia senyawa golongan flavonoid, senyawa fenolik, dan saponin. Berdasarkan nilai IC_{50} , daun bayam merah tidak berpotensi untuk dikembangkan sebagai agen antikanker terhadap sel HeLa dan sel WiDr.

Kata Kunci: *Amaranthus gangeticus*, MTT assay, sel HeLa, sel WiDr, sitotoksik.

Abstract

Conventional therapy is generally used as cancer therapy which has high costs and high side effects. The other therapeutic alternatives are needed, for example therapy with red spinach (*Amaranthus gangeticus*). The purpose of this study was to determine the cytotoxic activity of ethanolic extract of red spinach leaves against HeLa cells and WiDr cells and to determine the class of compounds in the ethanolic extract of red spinach leaves. Red spinach leaves were extracted by maceration method using 90% ethanol. The cytotoxic test was performed by MTT assay method and the results are IC_{50} values. The thin layer chromatography (TLC) method with silica GF245 as stationary phase and hexane: ethyl acetate (5: 5) as mobile phase was done to analyse compounds in the red spinach extract. The results showed that the ethanolic extract of red spinach leaves had an IC_{50} value of 209 $\mu\text{g/mL}$ on HeLa cells and did not show 50% inhibition of population on WiDr cells. The ethanolic extract of red spinach contains flavonoid, phenolic, and saponin. Based on IC_{50} values, red spinach leaves did not have potential to be developed as anticancer against HeLa cells and WiDr cells.

Keywords: *Amaranthus gangeticus*, MTT assay, sel HeLa, sel WiDr, cytotoxic.

1. PENDAHULUAN

Kanker adalah penyakit yang menyebabkan kematian tertinggi kedua di dunia, sehingga perlu penanganan yang benar dan cepat. Menurut IARC atau *International Agency for Research on Cancer* angka kematian akibat kanker terus meningkat di masyarakat. Data statistika secara umum menunjukkan terdapat 8,2 juta kasus kematian akibat kanker pada tahun 2012 dan 9,6 juta kasus akibat kanker pada tahun 2018 (IARC, 2019). Kanker kolon merupakan penyebab kematian akibat kanker

kedua pada pria dan wanita yang mengakibatkan 880.792 kasus kematian tahun 2018. Kanker serviks adalah penyebab kematian akibat kanker keempat pada wanita dengan jumlah kasus kematian sebesar 311.365 dan jumlah ini akan terus meningkat setiap tahunnya (Globocan, 2018). Di Indonesia kanker serviks dan kanker kolon menduduki peringkat ketiga dan keempat penyebab kematian pada wanita (Kemenkes RI, 2015).

Pengobatan kanker yang digunakan saat ini adalah terapi konvensional yang memiliki efek terapi yang cepat dan mudah didapatkan. Terapi konvensional memiliki kekurangan seperti efek samping yang tinggi dan biaya yang cukup mahal. Alternatif terapi selain terapi konvensional adalah menggunakan tanaman obat yang memiliki resiko efek samping yang rendah dan lebih aman dibandingkan terapi konvensional. Tanaman mempunyai kemampuan untuk memproduksi metabolit sekunder yang dapat dimanfaatkan untuk terapi pengobatan penyakit. Metabolit sekunder ini dinilai memiliki aktivitas farmakologi sebagai pengembangan pengobatan modern (Solanki *et al.*, 2013).

Tanaman keluarga *Amaranthaceae* bermanfaat bagi kesehatan, salah satunya menunjukkan aktivitas antikanker (Singh *et al.*, 2011). Aktivitas sitotoksik bayam merah (*Amaranthus gangeticus*) telah diteliti terhadap beberapa sel kanker seperti sel kanker hati HepG2 serta sel kanker payudara MCF-7 dan MDA-MB-231. Ekstrak etanol bayam merah menunjukkan aktivitas sebagai antikanker yang cukup poten terhadap sel kanker hati HepG2 dengan IC_{50} sebesar 27,75 $\mu\text{g/mL}$ dan sel kanker payudara MCF-7 dan MDA-MB-231 dengan IC_{50} berturut-turut sebesar 12,50 $\mu\text{g/mL}$ dan 27,75 $\mu\text{g/mL}$ (Sani *et al.*, 2004). Bayam merah mengandung senyawa fenolik, glikosida, flavonoid dan saponin (Rao *et al.*, 2011). Aktivitas antikanker bayam merah lainnya terdapat pada ekstrak etanol bayam merah (*Amaranthus cruentus*) terhadap sel kanker kolon HCT-116 dengan IC_{50} sebesar $138 \pm 4.24 \mu\text{g/mL}$. Berdasarkan analisis fitokimianya aktivitas sitotoksik *Amaranthus cruentus* dikaitkan dengan adanya metabolit sekunder terutama flavonoid kuersetin dengan mekanisme memediasi efek antikanker dan mengurangi metastasis kanker kolorektal intra peritoneal (Sekar *et al.*, 2017). Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui potensi antikanker ekstrak etanol daun bayam merah (*Amaranthus gangeticus*) terhadap sel HeLa dan WiDr dan golongan senyawa yang terkandung dalam ekstrak etanol daun bayam merah.

2. METODE

2.1 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah inkubator CO_2 (BINDER), *vacuum rotary evaporator* (Heidolph), *waterbath* (Mettler), mikropipet (Socorex), *Cytotoxic Safety Cabinet* (ESCO), *centrifuge*, blender (Cosmos), peralatan maserasi, almari pengering, *Beaker glass*, *vortex* (Maxi Mix II), corong, pipet Pasteur steril, ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) reader (Elx800 Bio Tech), neraca analitik (Ohaus), botol Schott Duran, *Laminar Air Flow* (LAF), *inverted microscope*

(Olympus CKX41), *hemocytometer* (Assistent), *counter*, cawan porselen, sonikator (Branson), pipa kapiler, lampu UV, dan bejana elusi.

2.2 Bahan

Bahan yang dibutuhkan pada penelitian ini adalah daun bayam merah yang diperoleh dari Karanganyar Surakarta, akuabides, 96-well plate, *Phosphate Buffered Saline* (PBS), media kultur *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI), dimetil sulfoksida (DMSO), larutan MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5 diphenyl- tetrazolium bromide), *Sodium Dodecyl Sulfat* (SDS) 10% dalam 0,01 N HCl (larutan stopper), aluminium foil, yellow tip, blue tip, conical tube, kertas saring, doksorubisin, etanol 90%, sel HeLa dan sel WiDr, *Fetal Bovine Serum* (FBS), penisilin-streptomisin, dan tripsin-EDTA, tabung mikro, silika gel GF254, akuades, heksana pa, etanol pa, etil asetat pa, dan aluminium foil.

2.3 Ekstraksi Daun Bayam merah

Ekstraksi dilakukan dengan menggunakan metode maserasi. Daun bayam merah ditimbang sebanyak 300 gram dan direndam dengan 1300 mL pelarut etanol 90% di dalam bejana maserasi selama 3 hari pada suhu ruang dengan beberapa kali pengadukan. Hasil maserasi berupa ekstrak cair disaring dan pelarut etanol 90% yang tersisa diuapkan dengan menggunakan *rotary evaporator*. Ekstrak cair hasil penguapan diletakkan pada penangas air hingga terbentuk ekstrak kental.

2.4 Uji Sitotoksik dengan MTT assay

Kultur sel ditransfer ke dalam 96-well plate dengan kepadatan sel setiap sumuran 1×10^4 sel/sumuran sebanyak 100 μ L dan disisakan 3 sumuran kosong sebagai kontrol media dan plate yang berisi sel diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37°C selama 24 jam. Distribusi sel diamati dengan menggunakan *interved microscope*. Plate berisi sel yang sudah konfluen diambil dari inkubator CO₂ dan dibuang medianya dengan cara disedot menggunakan pipet *pasteur* steril. PBS sebanyak 100 μ L dimasukkan ke dalam semua sumuran yang terisi sel untuk mencuci sel, kemudian PBS dibuang. Seri konsentrasi ekstrak (62,5; 125; 250; 500; 1000 μ g/mL), kontrol pelarut, dan kontrol positif doksorubisin (1,562; 3,125; 6,25; 12,5; 25 μ g/mL) dimasukkan ke dalam sumuran dan seri konsentrasi ekstrak direplikasi sebanyak 3 kali (triplo). Kemudian plate diinkubasi di dalam inkubator CO₂ pada suhu 37°C selama 24 jam. Setelah plate diinkubasi media sel dibuang dan sel didalam plate dicuci dengan PBS. Reagen MTT 5 mg/mL dalam PBS ditambahkan sebanyak 100 μ L ke dalam setiap sumuran, termasuk kontrol media (tanpa sel). Sel diinkubasi selama 2 jam di dalam inkubator CO₂ pada suhu 37°C (sampai terbentuk formazan), lalu kondisi sel diperiksa dengan *inverted microscope*. Jika formazan telah jelas terbentuk, maka ditambahkan larutan stopper (100 μ L SDS 10% dalam 0,01 N HCl). Plate dibungkus dengan aluminium foil dan diinkubasi di tempat gelap pada suhu kamar

selama semalam dan absorbansi dibaca dengan menggunakan ELISA reader (*Cancer Chemoprevention Research Center*, 2014).

2.5 Analisis Kandungan Senyawa dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Ekstrak daun bayam merah dilarutkan dalam etanol 90% dan ditotolkan menggunakan pipa kapiler di plat KLT silika gel GF254 lalu dielusi dengan menggunakan fase gerak heksana : etil asetat dengan perbandingan 5:5 yang sudah dijenuhkan. Plat KLT yang telah dielusi memberikan bercak akibat pemisahan kandungan senyawa pada daun bayam merah. Bercak hasil pemisahan dideteksi dengan mengamati plat KLT di pada sinar tampak, UV₂₅₄, dan UV₃₆₆ yang dapat diperjelas dengan mereaksikan bercak dengan reagen pereaksi yaitu reagen sitroborat untuk medeteksi senyawa flavonoid, FeCl₃ untuk mendeteksi senyawa fenolik, Liebermann-Burchard (LB) untuk mendeteksi senyawa saponin, dan kalium permanganat untuk medeteksi senyawa glikosida.

2.6 Analisis Data

2.6.1 Hasil uji sitotoksik

Parameter IC₅₀ digunakan untuk mengetahui aktivitas sitotoksik daun bayam merah adalah dengan cara menghitung persentase sel hidup menggunakan rumus :

$$\% \text{ Sel hidup} = \frac{(\text{Absorbansi perlakuan} - \text{Absorbansi kontrol media})}{(\text{Absorbansi kontrol pelarut} - \text{Absorbansi kontrol media})} \times 100\% \quad (1)$$

Berdasarkan perhitungan dengan rumus di atas, maka dibuat grafik log konsentrasi vs persentase sel hidup dibuat untuk mencari persamaan regresi linier. Nilai r dari persamaan regresi linier digunakan untuk menilai regresi linier yang dapat digunakan untuk menghitung nilai IC₅₀. Nilai IC₅₀ dihitung dengan cara memasukkan nilai 50% sebagai Y dan nilai IC₅₀ diperoleh dari antilog nilai X (konsentrasi) dari pada persamaan regresi linier (*Cancer Chemoprevention Research Center*, 2014).

2.6.2 Hasil KLT

Plat KLT yang telah dielusi dianalisis untuk mengidentifikasi kandungan senyawa pada bayam merah. Plat KLT yang telah dielusi menunjukkan adanya bercak yang dapat diamati di bawah lampu UV₂₅₄, UV₃₆₆, dan sinar tampak yang dapat diperjelas dengan mereaksikan bercak dengan peraksi melalui teknik penyemprotan. Pereaksi yang digunakan antara lain:

- a) Reagen FeCl₃ digunakan untuk mendeteksi senyawa fenolik yang ditandai dengan terbentuknya warna keabu-abuan sampai biru pada sinar tampak (Saifudin, 2014).
- b) Reagen sitroborat digunakan untuk mendeteksi senyawa flavonoid yang menghasilkan warna berfluoresensi hijau dan kuning di bawah lampu UV₃₆₆ (Saifudin, 2014)
- c) Reagen Liebermann-Burchard (LB) digunakan untuk mendeteksi senyawa saponin (Wagner and Bladt, 1996). Warna yang terbentuk saat pengamatan saponin di bawah lampu UV₃₆₆ adalah hijau (Handayani *et al.*, 2008).

- d) Kalium permanganat digunakan untuk mendeteksi senyawa glikosida dengan mendeteksi glikon (gula) yang akan membentuk bercak warna putih pada sinar tampak (Saifudin *et al.*, 2006).

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

3.1 Ekstraksi Daun Bayam merah

Metode ekstraksi maserasi sangat menguntungkan dalam isolasi senyawa kimia pada tanaman karena murah dan mudah dilakukan. Perendaman daun bayam merah dengan pelarut dapat mengakibatkan pecahnya dinding dan membran sel tanaman akibat perbedaan tekanan di dalam dan di luar sel, sehingga metabolit sekunder dalam sitoplasma terlarut dalam pelarut organik serta ekstraksi dapat berlangsung sempurna karena adanya proses pengadukan dan pengaturan lama perendaman (Yulianingtyas *et al.*, 2016). Maserasi daun bayam merah menggunakan pelarut etanol yang bersifat *universal* yang dapat menyari senyawa flavonoid, alkaloid, antrakuinon, steroid, glikosida, fenolik, damar, saponin dan klorofil (Putri, 2017). Etanol dalam jumlah banyak dapat menyari senyawa yang bersifat polar, semi polar, dan non polar karena mekanisme *like dissolves unlike* yang berarti pelarut polar dengan konsentrasi besar dapat menyari senyawa metabolit sekunder yang umumnya bersifat semi polar (Saifudin, 2014).

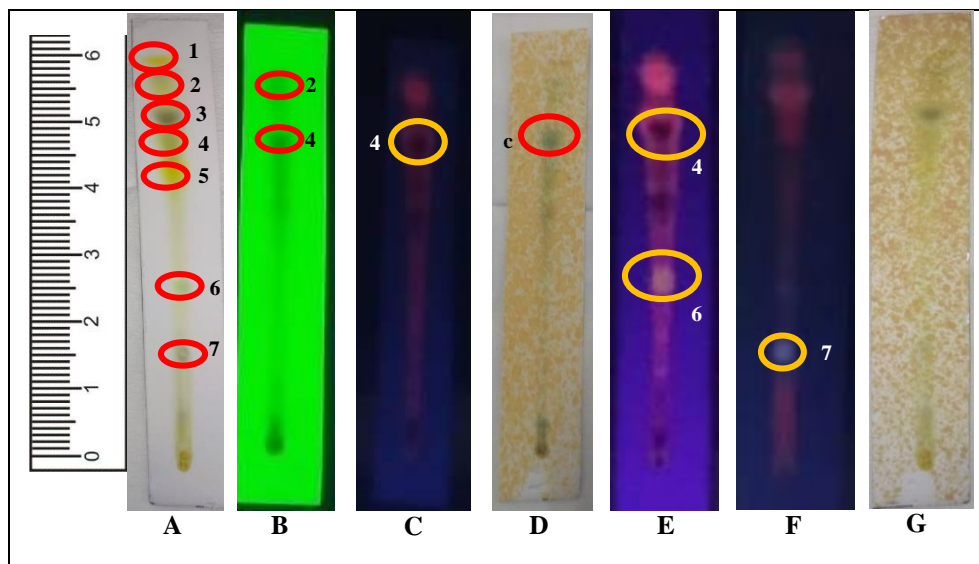
Ekstraksi maserasi menghasilkan ekstrak kental yang dapat dihitung rendemennya. Ekstrak yang dihasilkan berwarna hijau pekat, karena pelarut etanol tidak hanya mengekstraksi metabolit sekunder tetapi juga klorofil. Rendemen ekstrak etanol daun bayam merah yang diperoleh dari hasil maserasi adalah 7,47 %. Menurut Putri (2016), ekstraksi daun bayam merah dengan pelarut etanol menggunakan metode sokhletasi menghasilkan rendemen yang tinggi yaitu 12,83%. Nilai rendemen yang tinggi menunjukkan bahwa senyawa kimia di dalam ekstrak yang tersari oleh pelarut berada dalam jumlah yang banyak (Kartikasari *et al.*, 2017).

Nilai rendemen penelitian saat ini dengan penelitian sebelumnya berbeda. Faktor yang membedakan rendemen metode maserasi dan sokhletasi yaitu pemanasan. Pada metode maserasi, ekstraksi dilakukan pada suhu ruang sedangkan metode sokhletasi dilakukan dengan proses pemanasan yang dapat mempercepat proses penyarian daripada metode maserasi yang dilakukan pada suhu ruang. Suhu yang tinggi akibat pemanasan dapat menyebabkan molekul dan pelarut bergerak semakin cepat sehingga kontak senyawa kimia dalam ekstrak dengan pelarut semakin sering dan diperoleh ekstrak dan rendemen yang tinggi (Wijaya *et al.*, 2018). Pada metode maserasi kontak ekstrak dengan pelarut lebih lama, sehingga senyawa kimia yang tersari dalam jumlah banyak. Tetapi karena mekanisme perbedaan konsentrasi di dalam sel dan diluar sel (pelarut) yang dapat mencapai konsentrasi yang sama menyebabkan penarikan senyawa kimia konstan pada waktu tertentu. Hal ini berbeda dengan metode sokhletasi yang tidak mengalami persamaan konsentrasi antara di dalam dan

diluar sel sehingga hasil penyarian senyawa kimia lebih banyak yang ditandai dengan nilai rendemen cukup tinggi (Istiqomah, 2013). Keterbatasan metode maserasi dapat diatasi dengan modifikasi metode remaserasi untuk mendapatkan rendemen yang tinggi.

3.2 Uji Kandungan Golongan Senyawa dengan KLT

Kromatografi lapis tipis adalah metode pemisahan sederhana yang dapat mengakibatkan pemisahan karena perbedaan polaritas, yang ditandai dengan terbentuknya spot pada plat KLT (Wulandari, 2011). Uji KLT dilakukan untuk mengetahui senyawa yang terkandung didalam ekstrak etanol daun bayam merah dengan menggunakan fase gerak heksana dan etil asetat (5:5) (Gambar 1-4).



Gambar 1. Hasil KLT ekstrak etanol daun bayam merah. Hasil KLT sebelum disemprot reagen semprot pada sinar tampak (A), UV 254 nm (B), UV 366 nm (C), setelah diberi pereaksi FeCl_3 (D), sitroborat (E), Liebermann-Burchard (LB) (F), dan kalium permanganat (F).

Identifikasi kandungan kimia yang terdapat pada ekstrak etanol daun bayam merah dapat dilakukan dengan analisis secara kualitatif dengan mendeteksi golongan senyawa dengan bantuan reagen pereaksi dan diamati melalui sinar tampak dan sinar UV. Identifikasi golongan senyawa metabolit sekunder dilakukan dengan melihat reaksi antara spot pada KLT dengan reagen pereaksi seperti reagen sitroborat, FeCl_3 , Liebermann-Burchard (LB), dan kalium permanganat.

Hasil analisis uji KLT pada Tabel 1 menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun bayam merah mengandung senyawa golongan flavonoid, fenolik, dan saponin serta tidak mengandung glikosida (glikon). Ada perbedaan kandungan antara hasil dengan penelitian sebelumnya, yang menyatakan bahwa bayam merah mengandung metabolit sekunder golongan flavonoid, senyawa fenolik, saponin, dan glikosida (Rao *et al.*, 2010). Perbedaan kandungan ini dikarenakan sumber bayam merah yang digunakan berbeda karena peneliti sebelumnya menggunakan bayam merah dari Nizamabad India, sedangkan penelitian ini menggunakan bayam merah dari Karanganyar Indonesia. Perbedaan asal tanaman dapat mempengaruhi kandungan senyawa kimia karena perbedaan tanah, kandungan air,

lingkungan, dan iklim (Salim *et al.*, 2016). Penyebab tidak terbentuknya glikon dikarenakan tidak terjadinya hidrolisis karena pengaruh air dan metode ekstraksi tanpa pemanasan sehingga tidak ada pemutusan ikatan glikosida (Mulyani dan Gunawan, 2004). Selain itu, glikosida tidak dapat terdeteksi dengan KLT karena metode maserasi menarik glikosida alami pada daun bayam merah dalam jumlah sedikit serta metode deteksi glikosida pada penelitian sebelumnya menggunakan NMR yang dapat mendeteksi senyawa dalam jumlah kecil berdasarkan strukturnya (Jayaprakasam *et al.*, 2004).

Tabel 1. Hasil analisis kandungan ekstrak etanolik daun bayam merah dengan KLT

No	Rf	Plat KLT sebelum disemprot			FeCl ₃	Sitroborat	LB	KmnO ₄	Interpretasi
		Sinar tampak	UV ₂₅₄	UV ₃₆₆	Sinar tampak	UV ₃₆₆	UV ₃₆₆	Sinar tampak	
1	1	Kuning	Pemadaman	-	-	-	-	-	-
2	0,91	Kuning	Pemadaman	-	-	-	-	-	-
3	0,85	Hitam abu	Pemadaman	-	-	-	-	-	-
4	0,76	Kuning kehijauan	Pemadaman	Abu-abu	Abu-abu	Abu-abu	Abu-abu	-	Fenolik
5	0,71	Kuning	Pemadaman	-	-	-	-	-	-
6	0,41	Kuning	Pemadaman	-	-	Hijau kekuningan	-	-	Flavonoid
7	0,25	Hijau	Pemadaman	-	-	-	Hijau	-	Saponin

*LB : Liebermann-Burchard

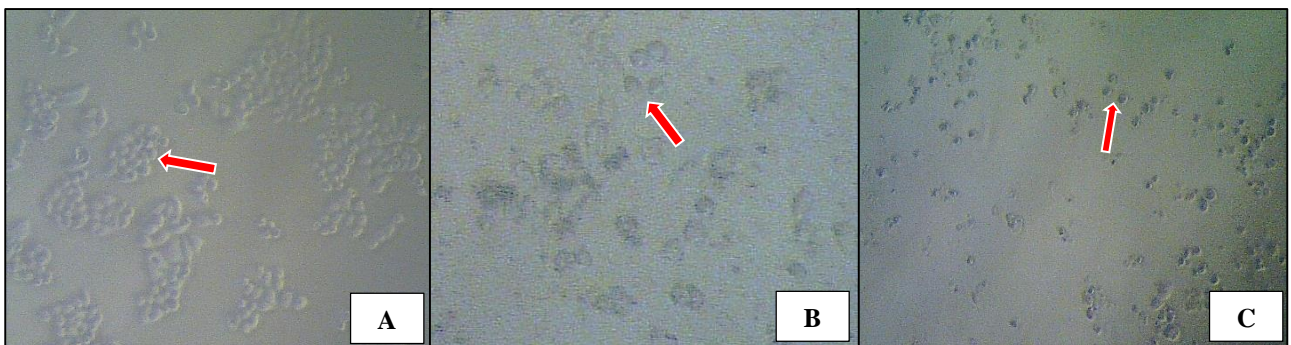
Pengamatan hasil KLT dipengaruhi dengan adanya klorofil yang tidak dipisahkan sehingga ikut terekstraksi oleh pelarut. Adanya klorofil ditandai dengan spot yang berwarna hijau setelah dielusi dengan fase gerak dan diamati pada sinar tampak (Gambar 1-A) dan fluoresensi berwarna merah pada pengamatan sinar UV₃₆₆ (Gambar 1-C). Pemisahan klorofil perlu dilakukan agar hasil analisis KLT tidak bias dengan menggunakan metode partisi yaitu fase air daun bayam merah ditambahkan dengan eter sejumlah 250 mL dan digojog hingga klorofil yang terlarut dalam fase air berpindah ke fase eter (warna hijau pudar), setelah itu dilakukan maserasi dengan pelarut etanol agar diperoleh ekstrak kental tanpa mengandung klorofil. Pelarut lain yang dapat digunakan selain eter adalah heksana dan toluen (Fardhani, 2014). Klorofil dalam bayam merah yang tersari oleh pelarut tidak memiliki aktivitas sitotoksik pada konsentrasi antara 100-500 µg/mL setelah di inkubasi selama 24 jam (Vasenick *et al.*, 2012).

3.3 Uji Sitotoksik

Uji sitotoksik adalah uji toksisitas secara *in vitro* dengan menggunakan sel yang dikultur pada suatu media yang bertujuan untuk mengetahui aktivitas antineoplastik suatu senyawa pada sel kanker tertentu dan menetapkan jumlah kematian sel dengan menggunakan parameter IC₅₀. Nilai IC₅₀ yang besar menunjukkan bahwa ketoksikan senyawa kecil atau tidak toksik (Haryoto *et al.*, 2013). Uji sitotoksik ekstrak etanol daun bayam merah terhadap sel kanker HeLa dan WiDr menggunakan metode uji MTT.



Gambar 2. Morfologi sel kanker HeLa. Sel sebelum diberi perlakuan/sel hidup (A), sesudah diberi perlakuan ekstrak etanol daun bayam merah dengan konsentrasi 500 µg/mL (B), dan setelah diberi perlakuan doksorubisin (C).



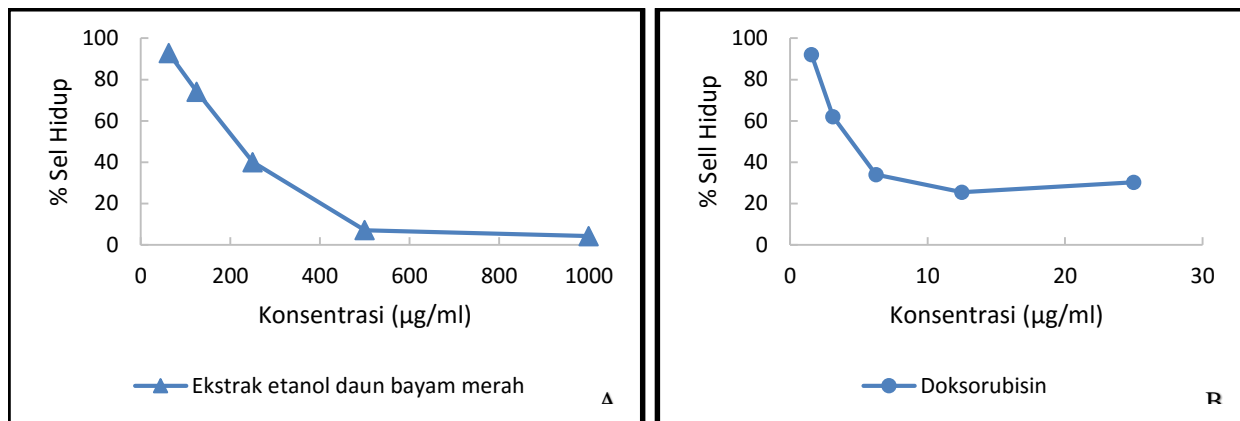
Gambar 3. Morfologi sel kanker WiDr. Sel sebelum diberi perlakuan/sel hidup (A), sesudah diberi perlakuan ekstrak etanol daun bayam merah dengan konsentrasi 500 µg/mL (B), dan setelah diberi perlakuan doksorubisin (C).

Perubahan morfologi sel kanker dapat digunakan untuk menganalisis uji sitotoksik jika sel kanker target mengalami perubahan secara spesifik. Sel kanker HeLa normal berbentuk bulat atau poligonal dengan sitoplasma yang mengelilingi inti sel, berukuran besar, dan berjumlah banyak serta bergerombol (Hutomo *et al.*, 2016). Pada penelitian ini, sel HeLa diberikan perlakuan ekstrak etanol daun bayam merah untuk mengetahui aktivitas penghambatan sel kanker. Morfologi sel HeLa mengalami perubahan setelah diberikan paparan ekstrak etanol daun bayam merah dengan konsentrasi 500 µg/mL. Sel HeLa mengalami pengurangan ukuran menjadi lebih kecil karena mekanisme lisisnya sitoplasma akibat pemberian ekstrak, berwarna gelap dan terpisah dari sel yang lain karena hilangnya daya lekat antar sel sehingga tidak bergerombol (Gambar 2-B). Sel HeLa diberi

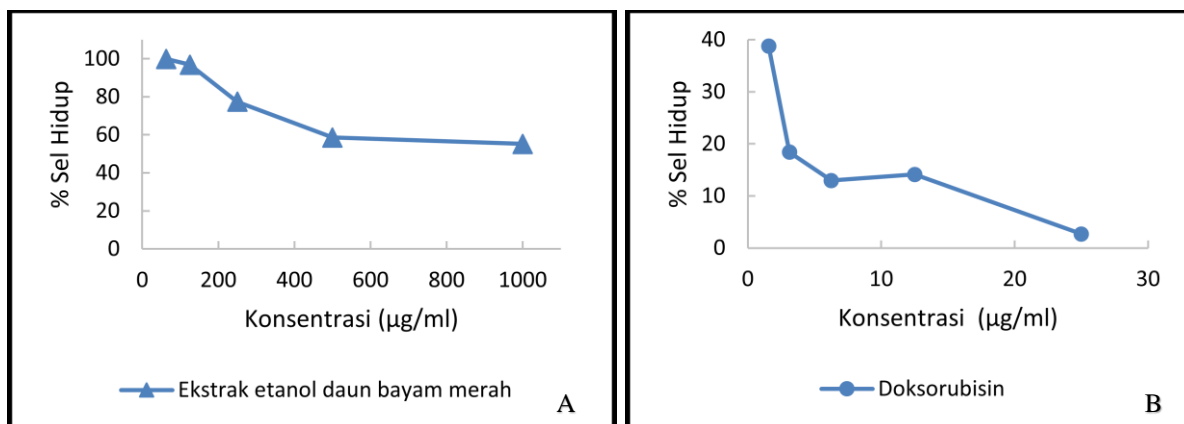
perlakuan doksorubisin sebagai kontrol positif yang berfungsi sebagai pembanding aktivitas sitotoksik ekstrak terhadap sel HeLa. Ekstrak etanol daun bayam merah berpotensi sebagai agen antikanker jika hasil uji sitotoksiknya mendekati atau sama dengan kontrol positif. Doksorubisin yang dipaparkan pada sel HeLa menyebabkan perubahan ukuran sel menjadi lebih kecil, berwarna gelap dan tidak menggerombol (Gambar 2-C) dibandingkan dengan kontrol sel (Gambar 2-A).

Sel kanker kolon WiDr normal berbentuk bulat, menempel atau bergerombol dengan sel lainnya, dan berukuran besar dan terang saat pengamatan karena terdapat sitoplasma yang mengelilingi inti sel yang dapat meneruskan cahaya dari *interved microscope* yang mengelilingi inti sel (Utami, 2015). Pada penelitian ini, morfologi sel WiDr setelah diberi ekstrak etanol daun bayam merah mengalami perubahan. Perubahan terjadi pada sel WiDr setelah diberi paparan ekstrak etanol daun bayam merah konsentrasi 500 µg/mL, sel yang mati terlihat lebih gelap dan berukuran lebih kecil karena hilangnya sitoplasma yang mengelilingi inti sel, berkurangnya kepadatan sel, dan sel terlihat tidak bergerombol (Gambar 3-B) dibandingkan sel WiDr sebelum perlakuan yang memiliki kepadatan tinggi, bergerombol, dan berukuran lebih besar serta berwarna lebih terang (Gambar 3-A). Sel WiDr juga diberikan doksorubisin sebagai kontrol positif yang hasilnya terdapat perubahan ukuran sel menjadi lebih kecil dan terpisah dari sel yang lainnya (Gambar 3-C).

Persentase sel hidup karena aktivitas sitotoksik daun bayam merah dapat dilihat pada Gambar 4-5. Konsentrasi ekstrak yang diberikan pada sel target berpengaruh pada jumlah sel yang bertahan hidup. Semakin tinggi konsentrasi ekstrak yang diberikan akan semakin banyak sel yang mengalami kematian, warna ungu dari kristal formazan yang terbentuk sedikit, dan absorbansi yang terbaca juga kecil. Ekstrak etanol daun bayam merah menunjukkan aktivitas sitotoksik yang mempengaruhi % populasi sel HeLa yang hidup menunjukkan pola *dose dependent*, yaitu jumlah sel yang hidup berkurang seiring dengan tingginya konsentrasi ekstrak yang diberikan (Gambar 4). Selain pemberian ekstrak etanol daun bayam merah, sel HeLa juga diberikan perlakuan doksorubisin sebagai kontrol positif yang hasilnya hampir sama linieritasnya dengan pola penghambatan *dose dependent* yang dihasilkan karena pemberian ekstrak etanol daun bayam merah. Pada penelitian Fatmawati (2011) doksorubisin memiliki aktivitas sitotoksik pada sel HeLa dengan IC₅₀ sebesar 5,559 µg/mL sedangkan pada penelitian ini, doksorubisin memiliki aktivitas sitotoksik pada sel HeLa ditandai dengan nilai IC₅₀ sebesar 6 µg/mL, artinya doksorubisin memiliki reproduktibilitas yang baik pada penelitian ini karena potensi antikanker doksorubisin terhadap sel HeLa mendekati potensi doksorubisin pada penelitian sebelumnya.



Gambar 4. Grafik pengaruh konsentrasi ekstrak etanol daun bayam merah dan dokсорубисин terhadap % sel hidup. Pengaruh ekstrak etanol daun bayam merah terhadap % sel hidup sel HeLa (A) dan pengaruh dokсорубисин terhadap % sel hidup sel HeLa (B).



Gambar 5. Grafik hubungan konsentrasi dan % sel hidup. Ekstrak etanol daun bayam merah dengan % sel hidup sel WiDr (A) dan dokсорубисин dengan % sel hidup sel WiDr (B).

Ekstrak etanol daun bayam merah menunjukkan aktivitas sitotoksik terhadap sel WiDr (Gambar 5). Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun bayam merah menghambat pertumbuhan sel kanker kolon WiDr. Semakin tinggi konsentrasi ekstrak semakin besar penghambatan terhadap pertumbuhan sel. Namun, pada sel WiDr tidak ada % sel hidup yang berada dibawah 50% artinya konsentrasi tertinggi ekstrak tidak dapat menghambat pertumbuhan sel sebanyak 50% dari populasi sel sehingga nilai IC_{50} tidak dapat dihitung. Hal ini dikarenakan ekstrak etanol daun bayam merah dengan konsentrasi tertinggi sebesar 1000 µg/mL hanya menghambat 55% sel hidup sel WiDr, sehingga untuk memperoleh 50% penghambatan populasi sel hidup diperkirakan konsentrasi yang diperlukan >1000 µg/mL. Kontrol positif dokсорубисин menunjukkan pola penghambatan yang dipengaruhi konsentrasi, semakin besar konsentrasi semakin besar penghambatan sel hidup. Hasil penelitian menunjukkan bahwa tidak ada % sel hidup sel WiDr yang berada diatas 50% dari populasi sel, sehingga nilai IC_{50} tidak dapat dihitung. Berdasarkan penelitian sebelumnya aktivitas sitotoksik dokсорубисин terhadap sel WiDr ditandai dengan nilai IC_{50} sebesar 2,43 µg/mL (Matsjeh *et al.*, 2017).

Konsentrasi doksorubisin terlalu tinggi menyebabkan persentase sel WiDr hidup < 50% sehingga nilai IC₅₀ doksorubisin tidak dapat dihitung. Hal ini karena doksorubisin dengan konsentrasi terkecil sebesar 1,562 µg/ml telah menghambat 38% sel hidup sel WiDr, sehingga untuk memperoleh 50% penghambatan populasi sel hidup diperkirakan konsentrasi yang diperlukan < 1,562 µg/ml.

Menurut *United State America National Cancer Institute*, suatu ekstrak berpotensi sebagai agen antikanker jika memiliki nilai IC₅₀ < 20 µg/mL (Srisawat *et al.*, 2013). Nilai IC₅₀ ekstrak etanol daun bayam merah terhadap sel HeLa dan WiDr > 20 µg/mL (Tabel 2). Berdasarkan penelitian sebelumnya, ekstrak etanol daun bayam merah (*Amaranthus gangeticus*) telah diteliti pada sel-sel kanker lain dan menunjukkan aktivitas penghambatan proliferasi sel yang cukup poten terhadap sel kanker hati HepG2 dengan IC₅₀ sebesar 27,75 µg/mL dan juga sel kanker payudara MCF-7 dan MDA-MB-231 dengan IC₅₀ sebesar 12,50 µg/mL dan 27,75 µg/mL (Sani, 2004). Hasil penelitian sebelumnya berbeda dengan penelitian yang dilakukan saat ini, yaitu terdapat perbedaan nilai IC₅₀ dan tingkat ketoksikan terhadap sel HeLa dan sel WiDr. Hasil penelitian ini menunjukkan ekstrak etanol daun bayam merah tidak memiliki aktivitas sitotoksik potensial terhadap sel kanker serviks HeLa dan sel kanker kolon WiDr.

Tabel 2. Hasil uji sitotoksik. Nilai IC₅₀ ekstrak etanol daun bayam merah dan kontrol positif doksorubisin pada sel HeLa dan sel WiDr.

Sel	IC ₅₀ (µg/mL)	
	Ekstrak etanol daun bayam merah	Doksorubisin
Sel HeLa	209	6
Sel WiDr	> 1000	< 1,562

Perbedaan penelitian dikarenakan perbedaan aktivitas sitotoksik dan kandungan metabolit sekunder. Aktivitas sitotoksik ekstrak etanol daun bayam merah terhadap sel HeLa dipengaruhi oleh kandungan metabolit sekunder yaitu flavonoid kuersetin (Khanam *et al.*, 2012). Metabolit sekunder flavonoid berpotensi sebagai agen antikanker yang memiliki berbagai mekanisme seperti inaktivasi zat karsinogenik, antiproliferasi, menghentikan siklus sel, menginduksi apoptosis, dan menghambat angiogenesis (Ren *et al.*, 2003). Berdasarkan hasil analisis kandungan dengan KLT, ekstrak etanol daun bayam merah mengandung senyawa flavonoid kuersetin yang dapat menghambat pertumbuhan sel kanker dengan menghambat sintesis enzim topoisomerase yang berperan penting pada sintesis dan replikasi DNA sel kanker (Mutiah *et al.*, 2018). Mekanisme ini yang diperkirakan terjadi pada penghambatan sel hidup sel kanker HeLa yang mengalami mutasi protoonkogen menjadi onkogen akibat infeksi virus HPV sehingga pertumbuhan sel kanker tidak terkendali.

Sel kanker WiDr yang bermutasi pada gen pemicu tumor P53 mengakibatkan ekspresi COX-2 yang tinggi sehingga memicu proliferasi sel WiDr. Aktivitas sitotoksik ekstrak etanol daun bayam merah terhadap sel WiDr dipengaruhi oleh kandungan glikosida 1,2-dilinoleoyl-3-galactosyl glycerol

(15, 16) yang memiliki mekanisme penghambatan pada enzim COX-2 yang dapat menginduksi karsinogenesis (Jayaprakasam *et al*, 2004). Ekstrak etanol daun bayam merah tidak dapat menghambat 50% sel hidup sel kanker WiDr karena senyawa glikosida alami dalam bayam merah yang terekstraksi dengan metode maserasi dalam jumlah kecil dan tidak cukup menimbulkan efek penghambatan 50%.

Perbedaan hasil penelitian juga dikarenakan terdapat beberapa modifikasi pada penelitian ini yaitu pada sel target yang digunakan, pada penelitian ini digunakan sel HeLa dan sel WiDr. Selain sel target yang digunakan, terdapat perbedaan pada metode ekstraksi yaitu pada proses persiapan bahan yang digunakan pada ekstraksi. Berdasarkan penelitian Sani (2004) ekstrak etanol bayam merah diteliti pada sel kanker HepG2 serta sel kanker payudara MCF-7 dan MDA-MB-231. Bahan bayam merah yang digunakan adalah bayam merah segar sedangkan pada penelitian ini menggunakan daun bayam merah yang dikeringkan terlebih dahulu sehingga senyawa metabolit sekunder yang memiliki aktivitas farmakologi dapat rusak akibat pemanasan berlebih dan tidak tersari dalam proses maserasi. Menurut Inayah (2017) pengeringan bayam merah dilakukan menggunakan oven dengan suhu 50°C selama kurang lebih 8 jam. Pada penelitian ini, suhu oven dan durasi pengeringan tidak terkontrol karena suhu dan durasi pengeringan berlebihan sehingga metabolit sekunder yang tersari dalam jumlah sedikit karena rusaknya metabolit sekunder. Pada penelitian ini suhu oven yang digunakan $\pm 60^{\circ}\text{C}$ dengan durasi pengeringan 18 jam.

Faktor lain yang menyebabkan perbedaan aktivitas sitotoksik adalah asal tanaman yang berbeda sehingga dapat memiliki kandungan yang berbeda juga. Perbedaan kandungan pada penelitian ini diperkirakan karena sumber bayam merah yang digunakan berbeda karena Sani (2004) menggunakan bayam merah dari Seri Serdang, Selangor, Malaysia sedangkan penelitian ini menggunakan bayam merah dari Karanganyar, Jawa Tengah, Indonesia. Perbedaan asal tanaman dapat mempengaruhi kandungan senyawa metabolit sekunder karena perbedaan tanah, kandungan unsur hara, air, dan lingkungan sehingga jumlah dan metabolit sekunder yang terkandung bervariasi dan memiliki aktivitas farmakologi atau sitotoksik yang berbeda (Salim *et al.*, 2016).

Perbedaan selanjutnya terdapat pada metode preparasi uji sitotoksik yaitu saat melarutkan ekstrak kental dengan pelarut DMSO yang menyebabkan ekstrak tidak terlarut sempurna dalam DMSO sehingga berpengaruh pada tingkat penghambatan sel hidup. Syarat untuk ekstrak yang digunakan dalam uji sitotoksik harus terlarut sempurna dalam DMSO (*Cancer Chemoprevention Research Center*, 2014). Pada uji sitotoksik sel WiDr ekstrak tidak dapat terlarut sempurna karena perbedaan tahapan pelarutan, seharusnya ekstrak dilarutkan dulu dengan DMSO hingga larut sempurna kemudian ditambahkan media kultur. Tetapi pada penelitian ini pelarutan ekstrak dilakukan bersamaan dengan penambahan DMSO dan media kultur.

4. PENUTUP

Berdasarkan hasil dan pembahasan diatas, ekstrak etanol daun bayam merah tidak memiliki aktivitas sitotoksik terhadap sel HeLa dan WiDr. Golongan senyawa yang terkandung dalam ekstrak etanol daun bayam merah adalah flavonoid, saponin, dan senyawa fenolik.

DAFTAR PUSTAKA

- Cancer Chemoprevention Research Center, 2014, *Protokol Uji Sitotoksik*, Terdapat di: http://ccrc.farmasi.ugm.ac.id/?page_id=240 [Diakses pada 27 Maret 2018].
- Fardhani H. L., 2014, Pengaruh Metode Ekstraksi Secara Infundasi Dan Maserasi Daun Asam Jawa (*Tamarindus indica*) Terhadap Kadar Flavonoid Total, *Skripsi*, fakultas Farmasi, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Fatmawati, D., Puspitasari P.L., Yusuf I., 2011, Efek Sitotoksik Ekstrak Etanol Sarang Semut (*Myrmecodia pendens*) pada Sel Line Kanker Serviks HeLa Uji Eksperimental Secara In Vitro, *Sains Medika*, 3 (3), 112-113.
- Globocan, 2018, *Cancer Fact Sheets for Colorectal Cancer*, Terdapat di : http://globocan.iarc.fr/Pages/facr_sheets_cancer.aspx?cancer=colorectal [Diakses pada 25 Januari 2019]
- Gunawan D., Mulyani S., 2004, *Ilmu Obat Alam*, Penebar Swadaya, Bogor.
- Handayani S., Adam H., Edy M and Zalarin U., 2008, Induction of Apoptosis on MCF-7 cells by *Selaginella* Fractions, *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 3 (04), 031-034.
- Hutomo S., Susilowati H., Suryanto Y.I., Kurniawan C., 2016, Perubahan Morfologi Sel HeLa Setelah Paparan Ekstrak Etanolik *Curcuma longa*, *Majalah Kedokteran Gigi Indonesia*, 2 (1), 1-5.
- IARC, 2019, *Cancer Today*, Terdapat di: <http://gco.iarc.fr/today/online-analysis> [Diakses pada 25 Januari 2019].
- Inayah N., 2017, Toksisitas Akut Ekstrak Etanolik Daun Bayam Merah (*Amaranthus tricolor*) Terstandar Dengan Pedoman Oecd 425 dan Gambaran Histopatologis Jantung, Hati, dan Ginjal Tikus *Sprague Dawley* Jantan, *Skripsi*, Fakultas Farmasi, Universitas Islam Indonesia, Yogyakarta.
- Istiqomah, 2013, Perbandingan Metode Ekstraksi Maserasi dan Sokletasi Terhadap kadar Piperin Buah cabe Jawa (*Piperis retrofacti*), *Skripsi*, Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan, UIN Syarif Hidayatullah, Jakarta.
- Kartikasari D., Nurkhasanah, Pramono S., 2017, Karakterisasi Simplisia dan Ekstrak Etanol Daun Bertoni (*Stevia rebaudiana*) dari Tiga Tempat Tumbuh, *Thesis*, Fakultas Farmasi, Universitas Ahmad Dahlan, Yogyakarta
- Kemenkes RI, 2015, *Infodatin : Stop Kanker*, Terdapat di: <http://www.depkes.go.id/resources/download/pusdatin/infodatin/infodatin-kanker.pdf> [Diakses pada 23 Maret 2018].
- Khanam U.K.S., Oba S., 2012, Bioactive Substances in Leaves of Two *Amaranth* Species, *Amaranthus tricolor* and *A.hypochondriacus*, *Canadian Journal Of Plant Science*, 9 (3), 47-58.
- Matsjehi S., Swasono R.T., Anwar C., Solikhah E.N., Lestari L., 2017, *Synthesis Of 2',4-dihydroxy-3-methoxychalcone and 2',4',4-trihydroxy-3-methoxychalcone as a Candidate Anticancer*

- Against Cervical (HeLa), Colon (WiDr), and Breast (T47D) Cancer Cell Lines In Vitro*, International Conference on Chemistry, Chemical Process and Engineering (IC3PE), Indonesia.
- Mutiah R., Suryadinata A., Nurani P.S., 2018. Uji Sitotoksik Kombinasi Cisplatin dengan Ekstrak Etanol Benalu Alpukat (*Dendrophthoe pentandra*) pada Sel HeLa, *Majalah Kesehatan*, 5 (3), 133-143.
- Putri A.E., 2017, Uji Aktivitas Antikanker Ekstrak Etanol Daun Benalu Mangga (*Dendrophthoe pentandra*) dari Beberapa Lokasi di Indonesia terhadap Cell Line Kanker Payudara T47D, *Skripsi*, Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan, UIN Maulana Malik Ibrahim, Malang.
- Putri C.A., Pradana D.A., Susanto Q., 2016, Effect of Standardized Ethanol Extract of Red Spinach (*Amaranthus tricolor*) to Body Mass Index and Blood Glucose Level on High Fat Diet Fed *Sprague Dawley* Rats as an Obesity Prevention, *Pharmacy*, 13 (2), 150-161.
- Rao K.N.V., Padhy S.K., Dinakaran S.K., Banji D., Madireddy S., Avasarala H., 2010, Study of Pharmacognostic, Phytochemical, Antimicrobial and Antioxidant Activities of *Amaranthus tricolor* Linn. Leavs Extract, *Iranian Journal Of Pharmaceutical Sciences Autumn*, 6 (4), 289-299.
- Ren W., Qiao Z., Wang H., Zhang L., Zhu L., 2003, Flavonoids : Promising Anticancer Agents, *Medicinal Research Review*, 20 (4), 519-534.
- Saifudin A., Suparti., Anang F., Muhammad D., 2006, Biotransformasi Kurkumin Melalui Kultur Suspensi Sel Daun *Catharanthus roseus* Berbunga Merah, *Jurnal Penelitian Sains & Teknologi*, 7 (2), 92 – 102.
- Saifudin A., 2014, *Senyawa Alam Metabolit Sekunder Teori, Konsep, dan Teknik Pemurnian*, Deepublish, Yogyakarta.
- Salim M., Yahya., Sitorus H., Ni'mah T., Marini., 2016, Hubungan Kandungan Hara Tanah dengan Produksi Senyawa Metabolit Sekunder pada Tanaman Duku (*Lansium domesticum*) dan Potensinya sebagai Larvasida, *Jurnal vektor Penyakit.*, 10 (1), 11-16.
- Sani H.A., Ragmat A., Ismail M., Rosli R., Endriani S., 2004, Potential Anticancer Effect of Red Spinach (*Amaranthus gangeticus*) Extract, *Asia Pac J Clin Nutr*, 13 (4), 396-400.
- Sekar V., Jayshree., 2017, Phytochemical Analysis and *in vitro* Anticancer Study of Ethanolic Extract of Leaves of *Amaranthus cruentus* Against Colon, *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 6 (5), 1644-1658.
- Singh N., Singh P., 2011, *Amaranth : Potential Source for Flour Enrichment*, Flour and Breads and their Fortification in Health and Disease Prevention, *Guru Nanak Dev University, India*.
- Solanki S.S., Selvanayagam M., 2013. Phytochemical Screening and Study of Predictive Toxicity of Certain Medicinal Plants and Extracts Using Brine Shrimp, *Journal Herbal Science Technology*, 10 (1), 1-4.
- Srisawat T., Chumkaew P., Heedchim W., Sukpondma Y., Kanokwiroon K., 2013, Phytochemical Screening and Cytotoxicity of Crude Extracts of *Vatica diospyroides* Symington Type LS, *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 12 (1), 71-76.
- Utami M.T., 2015, Pengaruh Ekstrak Etanolik Daun Sirih Merah (*Piper crocatum*) Pada Sel Kanker Kolon WiDr, *Skripsi*, Fakultas Farmasi, Universitas Sanata Dharma, Yogyakarta.
- Vesenick D.G., Depaula N.A., Niwa A.M., Mantovani M.S., 2012, Evaluation of the Effects of Chlorophyllin on Apoptosis Induction, Inhibition of Cellular Proliferation and mRNA

Expression of *CASP8*, *CASP9*, *APC* and β -catenin, *Journal of Biological Sciences*, 4 (3), 315-322.

Wagner H., Bladt, S., 1996, *Plant Drug Analysis: A Thin Layer Chromatography Atlas 2nd Edition*, Springer, New York.

Wijaya H., Novitasari., Jubaidah S., 2018, Perbandingan Metode Ekstraksi Terhadap Rendemen Ekstrak Daun Rambai Laut (*Sonneratia caseolaris*), *Jurnal Ilmiah Manuntung*, 4 (1), 79-83.

Wulandari L., 2011, *Kromatografi Lapis Tipis*, Taman Kampus, Jember.

Yulianingtyas A., Kusmartono B., 2016, Optimasi Volume Pelarut dan Waktu Maserasi Pengambilan Flavonoid Daun Belimbing Wuluh (*Averrhoa Bilimbi*), *Jurnal Teknik Kimia*, 10 (2), 58-64.